

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
**Image Problem Mailbox.**

## ⑫ 公開特許公報 (A) 平2-154697

⑬ Int. Cl. 5

C 12 Q 1/04  
C 12 M 1/34

識別記号

府内整理番号

6807-4B  
8717-4B

⑬ 公開 平成2年(1990)6月14日

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全22頁)

⑭ 発明の名称 微生物の培養検出方法

⑫ 特願 昭63-309257  
⑫ 出願 昭63(1988)12月7日

|       |           |                     |
|-------|-----------|---------------------|
| ⑬ 発明者 | 植田 成      | 静岡県田方郡庵山町南條1421-237 |
| ⑬ 発明者 | 渡辺 一弘     | 東京都目黒区碑文谷5-29-2     |
| ⑬ 発明者 | 美崎 英生     | 静岡県田方郡大仁町吉田775      |
| ⑬ 出願人 | 東洋醸造株式会社  | 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1  |
| ⑬ 代理人 | 弁理士 小林 和憲 | 外1名                 |

## 明細書

## 1. 発明の名称

微生物の培養検出方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 被検液を透明容器に添加し、該透明容器に通気性を有するが透水性が非常に低くかつ被検液中の微生物より小さい細孔を有するシートからなる挿入体を挿入し、該透明容器と挿入体との間に存在する栄養分およびゲル化剤を含む成分層の表面および/または内部において被検液中の微生物を培養せしめ、該培養によって増殖した微生物を透明容器外から検出するようにしたことを特徴とする微生物の培養検出方法。

(2) 挿入体の内面側に指示薬を保持してなる請求項1記載の微生物の培養検出方法。

(3) シートが通気性を有しつつ透水性が非常に低くしかも細孔が被検液中の微生物よりも大きくてもよいシートを撥水処理することにより得られた撥水処理シートである請求項1または2記載の微生物の培養検出方法。

(4) 撥水処理シートがシリコン処理紙、ポリエチレン処理紙またはシリコン処理布である請求項3記載の微生物の培養検出方法。

(5) シリコン処理紙がシリコン処理分液漉紙である請求項4記載の微生物の培養検出方法。

(6) 指示薬が星色剤、蛍光剤または発光剤である請求項2記載の微生物の培養検出方法。

(7) 微生物が増殖する間に挿入体の内面側に保持している指示薬が成分層に移行して微生物と指示薬とが接觸することにより生じる星色、蛍光または発光を検出してなる請求項1、2または6記載の微生物の培養検出方法。

(8) 成分層のゲル化剤が

- ① 被検液と共に外部より添加される場合、
- ② 透明容器の内面側に保持されている場合
- ③ 挿入体の外側に保持されている場合
- ④ 一方が透明容器の内面側に保持され、他方が外部より添加される場合
- ⑤ 一方が挿入体の外側に保持され、他方が外部より添加される場合、および

⑥一方が透明容器の内面側に保持され、他方が押入体の外面側に保持されている場合の群より選ばれた形態で存在せしめられることを特徴とする請求項1または2記載の微生物の培養検出方法。

⑨成分層の栄養分が

①被検液と共に外部より添加される場合

②透明容器の内面側に保持されている場合、および

③押入体の外面側に保持されている場合の群より選ばれた形態で存在せしめられることを特徴とする請求項1、2または8記載の微生物の培養検出方法。

⑩ゲル化剤および/または栄養分が透明容器および/または押入体に保持される場合には、乾燥状態で保持されることを特徴とする請求項8または9記載の微生物の培養検出方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### 〔産業上の利用分野〕

本発明は透明容器と、これに押入される特定の

シートからなる押入体との間に存在する成分層の表面および/または内部に被検液中の微生物を培養させて、透明容器外から検出し得るようにした簡便な微生物の培養検出方法に関する。

#### 〔従来の技術〕

食品等の微生物検査で、通常用いられているところの寒天を用いる混和平面培養法(シャーレ法)は、

1. 寒天培地を加熱溶解させる。

2. オートクレーブで加圧滅菌する。

3. 被検試料の一連の希釈物の一部をシャーレに入れる。

4. 冷却してあるが、まだ液体状態にある寒天培地をそれぞれシャーレに加え、試料と寒天培地が均一に混ざるようにシャーレを回転させながら、混和し、放置固化させる。

5. シャーレに蓋をして倒置させた状態で一定温度で培養を行い、シャーレ中に発育するコロニー数を肉眼で計測する。

以上の5つの工程により微生物の培養検出を行

わなければならないため、操作が極めて煩雑であった。

それ故、このための簡易培養検出法として、

①寒天表面で培養する方法。

②吸収材に吸着させ、その表面で培養する方法。

③試験管内面、又はスライドグラス上で培養する方法。

④フィルター表面で培養する方法。

⑤液体培地を用いる方法。

などが提案された。

上記①の方法としては、固化した寒天上に試料を滴下させるDrop plate method、コンラージ棒を使用して試料を広げるSurface plate method、又、Stamp spread method、Agar sausage methodなど(微生物の検査法昭和56年8月30日第二版発行、発行所工業技術会)がある。

②の方法としては、栄養分を含んでいる滤紙に試料を吸収させるBacto strip me

thod(微生物の検査法昭和56年8月30日第二版発行、発行所工業技術会)がある。

③の方法としては、微生物をTest tube methodなど(微生物の検査法昭和56年8月30日第二版発行、発行所工業技術会)がある。

④の方法としては、微生物をメンブランフィルター上に捕捉し、フィルターの逆の面より栄養分を補給して培養する方法(微生物の検査法昭和56年8月30日第二版発行、発行所工業技術会)がある。

更に、最近においては乾燥培養プレートの研究が盛んに進められており、例えば、特許出願公表昭57-502200号(スリーエム社製、米国、商品名ペトリフィルム)が知られている。このものは主として、ベースフィルムに必要な物が含まれかつすぐに使用できる細菌用培養基が塗布され、表面からポリエチレンフィルムでカバーされている。このベースフィルムは標準的な栄養素、及び冷水に可溶なゲル化剤も有している。又カバ

—フィルムにはゲル化剤の他に計数を容易にするため、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)が塗布されている。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、前記①の方法は、寒天の表面で培養せしめるため、技術的な熟練度を必要とし、②の方法は、滤紙に被検液を吸収させるために、滤紙の細孔に微生物が入り込む可能性があり、半定量的にならざるを得ない。③の方法は、操作が煩雑である。更に④の方法は、滤過操作が必要なために沈澱物のある物は、前処理を必要とする。

更に、コロニーの計測を容易にするために微生物染色剤を使用することが行われており、前記のスリーエム社製のペトリフィルムにもTTC(トリフェニルテトラゾリウムクロライド)が塗布されている。しかしながら、これら染色剤がある種の微生物に対し毒性を示す場合がしばしばあり、培養試験とTTC等のテトラゾリウム化合物とが共存する試験シートにおいては、細胞コロニーの正確な数の把握が困難となる場合がある。この解

決のために、例えば染色剤をマイクロカプセル化することにより徐放性をもたせ、微生物の増殖がある程度進むまで微生物との接触を妨げさせる等の方法があるが、満足すべきものではなかった。

(課題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、透明容器にゲル化剤および培地を添加し、これにシートからなる挿入体を挿入することにより、透明容器と挿入体との間に存在するゲル中またはその表面において微生物を培養することに着目した。上記のシートとしてはシリコン処理分液滤紙を用い、微生物が増殖する面とは逆の面、すなわち挿入体の内面側に呈色剤を塗布することにより、シートの材質と相まって微生物の増殖が進行するまで、でき得る限り、呈色剤と微生物との接触を遅らせ、より正確なコロニーの検出が実現できるようにして、従来技術の種々の課題を解決することに成功した。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたものであって、被検液を透明容器に添加し、該透明容器に通気性を有するが透水性が非常に低くかつ波

検液中の微生物より小さい細孔を有するシートからなる挿入体を挿入し、該透明容器と挿入体との間に存在する栄養分およびゲル化剤を含む成分層の表面および/または内部において被検液中の微生物を培養せしめ、該培養によって増殖した微生物を透明容器外から検出するようにしたことを行つて、その目的とするところは、従来法に比べてより簡便でしかも応用範囲の広い極めて簡単かつ正確な培養検出が行えるようにした微生物の培養検出方法を提供することにある。

更に本発明の目的は、コロニー計測を容易にするための指示薬が微生物の増殖に悪影響を与えないようにした微生物の培養検出方法を提供することにある。

先ず本発明の方法を実施するための好適な培養容器について説明する。

(実施例)

本発明の方法を実施するために使用される第1図の第1実施例に示した培養容器1は、透明容器

2と該容器2に挿入される挿入体3と、これらの開口面に被嵌される例えばブチルゴムから成型された蓋4とから構成される。透明容器2は、有底筒状に形成され、培養後、微生物を透明容器2外より観察することができるよう透明度を有し、しかもある程度の硬度を持つ材質から成型される。このような材質としては、例えば成型性がよくコストの安いポリスチレン、ポリエチレン樹脂、硬質塩化ビニル樹脂などが挙げられる。挿入体3も前記の透明容器2と同様に、有底筒状に成型されている。挿入体3としては、原則的にはある程度の非透水性を有する材質であることが必要である。これは挿入体3と透明容器2との間に形成される間隙5内のゲルの含水率が非常に高いためで、透水性の高いものを挿入体に用いると培養の間、ゲルの体積が減少し、液面が下がったり、あるいはゲル層に隙間が出来てしまうからである。また、培養後にコロニーを観察するとき、透明容器外より観察するので、挿入体は非透明であることが望ましいが、透明の場合には挿入体の内側に更

に別の不透明体を挿入するようすればよい。

第1図の培養容器による培養操作の一例は、蓋4を透明容器2の開口部から外し、透明容器2から挿入体3を抜き取り、透明容器1内に一定量のゲル化剤、栄養分を含んだ被検液を流し込む。ここでいう一定量とは、透明容器2内に挿入体3を挿入し、透明容器2と挿入体3との間に形成される間隙5に前記被検液の液面が押し上げられた時、挿入体3内に被検液がこぼれて流れ込むことなく、側面に薄層ができる量であり、これは該間隙の厚さ、容器の大きさにより規定される。間隙5の好ましい範囲としては、0.05mm～3mm程度と考えられるが、その厚さは、目的に応じて決定すればよい。

第2図の第2実施例に示された培養容器1は、挿入体3を透明容器2内の適切な位置に保持するため、透明容器2と挿入体3との底面の中心部に、位置決め機構6が設けてある。この位置決め機構6は、透明容器2の内底面に形成された凹部7と挿入体3の外底面に突設された凸部8とから構

成され、これらの凹凸関係により、挿入体3が常に適切な位置に位置決め保持され、間隙5の厚さが常に一定とされる。上記の凹部7と凸部8との配置関係は逆配置であってもよい。蓋4は透明容器2と挿入体3との開口部に装着され、蓋4の内面が挿入体3の開口面に押し付けられることにより、挿入体3がみだりに動かないようにすること、および培養中における水分の蒸発を防止する役目を兼ねている。

透明容器2内に挿入体3を安定した状態で保持するための位置決め機構の他の例としては、第3図の第3実施例に示されように構成することもできる。透明容器2の内底面に環状筒9を突設し、該環状筒9には、円周方向に適当な間隔を保って中心方向に突き出る突起10を本例の場合4個設ける。これらの突起10に囲まれた空間部内に挿入体3の下端部を挿入し、四箇所の支持により位置決め保持せしめる。尚、突起10は4個に限定されず、任意に選択できる。

更に、位置決め機構6の他の例としては、第4

図の第4実施例に示す如く、透明容器2の内底面に断面が逆円錐形状をした凹所11を設け、該凹所11に挿入される円錐凸部12を挿入体3の外底面に形成する。

更に又、位置決め機構6の他の例としては、第5図および第6図の第5実施例に示す如く、透明容器2の内面にその上端開口面から内底面にわたり2つの垂直平面11、12を持った扇形状の挿入空間部13を設ける。この挿入空間部13に挿入される挿入体2は2つの垂直平面14、15を持った扇形状に形成される。挿入空間部13に挿入体3を挿入せしめ、挿入空間部13の垂直平面11、12に対して挿入体3の垂直平面14、15をそれぞれ合致せしめる。すると、透明容器2と挿入体3との間隙5は、透明容器2の弧状内周面と挿入体3の弧状外周面との間に形成されることになる(第5図参照)。

上記の培養容器において、透明容器2と挿入体3との間に形成された間隙5に薄層ゲルを存在せしめる。このゲル中または/および表面に微生物

を培養する場合は、例えばゲルの固さに関する問題がある。通常、混和平面培養法にゲル化剤として用いられる寒天は、1.5～2.0%程度の濃度がよく用いられている。また、流し込む培地量としては、食品検査における一般生菌数測定についての公定法を例にとれば9cmの直径のシャーレに約15mlである。これは培地の厚さに換算すると約3mmに相当する。この場合、寒天温度を下げるに、ゲルが軟らかくなり、寒天が凝固し、シャーレを倒置する際、ゲルが崩れてしまう危険性がある。又、培地量を15ml以下にした場合も、予め用意されている被検液に入っているシャーレに寒天培地を加え、静かに回転または前後左右に傾斜させ混合するのであるが、被検液がシャーレ全体に分散しなくなる。したがって、培養中コロニーが出現したときに、コロニーがシャーレのある部分に偏って、コロニーの計測が困難になる場合も生じる。本発明による培養方法によれば、上記の問題点はすべて解決される。すなわち、シャーレを倒置したときに、ゲルが崩れてしま

うような軟らかい場合でも、透明容器と押入体との間の間隙により確実にゲルが支持されるので、崩れることはない。例えば寒天を例にとれば、0.3%程度の濃度でも培養が可能となる。また、本発明による透明容器と押入体との間にできる間隙の厚さが0.1mm程度と薄くても押入体を透明容器に押入し、被検液を押上げることにより、検体を均一に分散させることができる。

更に、本発明の培養方法に使用される培養容器として、間隙5の厚さが部分的に異なるよう形状を規定することも可能である。このような例としては、第7図の第6実施例に示されるように、透明容器2と押入体3とを四角柱に形成する。そして、透明容器2内に押入体3を押入することにより、相対向する面、本例においては第7図において左右方向に間隙40と41とを形成する。一方に形成される間隙40の厚さをD、他方に形成される間隙の厚さをdとするならば、外部から添加したゲル化剤を含んだ被検液が、均一でありさえすれば、被検液中の総細胞数はD:dの比率で

分配され、一つの検体で二つの希釈系列として検出できることになり、それだけ細胞数未知の検体の希釈の手間が省けることになる。尚、上記の間隙40、41は第7図において上下に形成するようとしてもよい。

更に、第8図に示した第7実施例においては、透明容器2の開口面を閉じる蓋4が押入体3と一緒に形成してある。透明容器2の開口縁の全周には係止凸部20が設けてある。この係止凸部20に係止凹部30が係脱可能に係止される。係止凹部30は押入体3の開口縁に一体に設けてある。しかるに、押入体3を透明容器2内に押入し、係止凹部30を係止凸部20に嵌め込むことにより押入体3と一緒に蓋4が透明容器2の開口面を閉じることになる。

本発明においては、押入体の材質としては、完全なる非透水性かつ非通気性の材質は用いることができない。なぜならば、押入体の内面側に保持される指示薬が、内側から外側へ移行できないからである。指示薬を押入体の内側から外側へ移行

させるためには、ごく僅かの水が押入体の内外面の間を移動できなくてはならない。そのためには、完全なる非透水性ではなく、適度の非透水性を有する材質に限定される。ここでいう適度の非透水性とは、押入体と透明容器との間の間隙でゲル化したゲル中の水分を微生物の培養が終了するまでの間、ゲルの形を変形させ得ない程度に保持し得る非透水性という意味である。従って、ゲル化剤の性質、特に保水能と密接にリンクするものである。

このような材質を有する押入体としては、通気性を有するが透水性が非常に低く、かつ細孔が微生物より小さいシートからなるものである。このシートの例としては、通気性および透水性を有するシート、例えば紙、布などのシートを撥水処理することにより得られる撥水処理シートが挙げられる。

撥水処理する方法としては、前記紙、布などのシートをシリコンで処理する方法が挙げられる。前記紙、布などのシートをシリコン処理すること

により、通気性を有するが、透水性が非常に低くなり、その結果、その細孔は微生物が通過できなくなる程度の大きさに変化する。このような撥水処理シートの例としては、ワットマン社、アドバンテック東洋社などから市販されているシリコン処理分液滤紙が挙げられる。この分液滤紙は、通常の滤紙をシリコン処理したものであり、水をはじく性質を有するため、通気性を有するが、透水性が非常に低いので、押入体の材質として本発明に適している。すなわち、液状の状態でゲル化剤および培養液を含む溶液を透明容器に添加し、該分液滤紙からなる押入体を押入し、ゲル化させる場合、ゲル化剤がゲル化するまでの間、押入体表面は液体と接するのであるが、該押入体は非透水性を有するために、液体は殆ど滤紙にはしみ込まない。また、微生物も押入体の内部に入り込むことが出来ず、ゲル内部に全て止まるので、押入体の材質として適している。

上記のシリコン処理シート以外に、それ自体微生物を通す大きさの細孔を有するような紙、布な

どのシートであっても、ポリマーで処理することにより、通気性を有するが、透水性が非常に低く、かつその細孔が微生物より小さい材質のもとすれば本発明に使用できる。

前記以外の材質を有する押入体としては、ある特定の材質を有するメンブランフィルターからなる押入体が挙げられる。このメンブランフィルターとしては、四重化エチレン樹脂を原料とするメンブランフィルターが好ましい。このメンブランフィルターの孔径は、0.1～5 μmの範囲で各種あるが、このように非透水性の強い、換言すれば吸水性の低い材質を用いた場合、本押入体として使用できる。

本発明においては、増殖した微生物をコロニーとして検出するに際しては、指示薬を用いて検出するのが好ましい。そのためには、この指示薬をシートからなる押入体の内面側、すなわちゲルと接触する面とは逆の面に予め保持させておき、微生物が増殖する間に、シートの内面側から外面側に指示薬の一部が移行し、その結果、微生物と指

示薬とが接触し、微生物の作用により該指示薬が検出可能な成分に変化させればよい。指示薬をシートに保持させるには、指示薬をシートに塗布してもよいし、接着してもよい。

指示薬としては、微生物の作用により呈色する呈色剤、蛍光を呈する蛍光剤あるいは発光を呈する発光剤が挙げられる。呈色剤としては、微生物の作用により還元されて無色の物質が有色の物質に変化するものが好ましい。例えば、還元時に有色のホルマゾン染料になる種々のテトラゾリウム化合物、具体的にはトリフェニルテトラゾリウムクロライド(TTC)、2-(p-ヨードフェニル)-3-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロライド(INT)、3,3-(3,3-ジメトキシ-4,4-ジフェニレン)-ビス[2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロライド]、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロマイド(MTT)などやニュートラルレッド

のようなpH変化に感受性のものなどが用いられる。

蛍光剤としては、微生物の作用、例えば産生されるジアホラーゼの作用により還元されて蛍光を発し、UV照射などにより検出可能な物質に変化するものが用いられる。例えばレサズリンなどが挙げられる。このものはレゾルフィンに変化し、この蛍光を測定することによりコロニーを検出する。

発光剤としては、微生物の作用により酸化されて発光を呈する物質に変化するものが用いられる。例えば、ルミノールなどが挙げられる。

本発明で使用される押入体がフィルムのように強度がない場合、その内側に支持体を設けることもできる。一例として押入体の内側に透明容器と同じ材質の支持体を設ければよい。また、この場合、押入体をその支持体に接着することもでき、そのとき、押入体は底部閉鎖である必要はない。押入体としては、第9図(a)に示すように中空円筒状に形成された支持体40の全周面に通気孔

130を形成したり、また(b)図の支持体40に示すようにスリット131を該支持体の軸線方向に沿って形成し、押入体の通気性を損わないようにすればよい。尚、このスリットは軸線方向ではなく、支持体の円周方向に形成するようにしてもよい。第9図(c)に示す支持体40は、ロッド132の上下端に円盤133、134を固定し、円盤133には切り抜き孔135を形成する。

次に、本発明の方法により微生物を培養する場合の原理説明をすると、透明容器に培養に必要な成分を保持せしめる面としては、第10図に示されるようにする。

符号Aで示した透明容器2の内面側、符号Bで示した押入体3の外側、符号Cで示した押入体3の内面側である。そして、上記符号A、Bで示した面にはゲル化剤、栄養分からなる群より選ばれる一種または二種以上の試薬を、Cの面には細胞染色剤がそれぞれ保持される。

ゲル化剤は、例えばメカラギーナンやゲランガムなどのように、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>などのイオン存

在下でゲル化するものがあるので、構成としてはそれらを別々に保持、あるいは一方を保持、もう一方を外部より溶液添加することができる。したがって、ゲル化剤が一種類のときにおける保持構成としては、透明容器の内面側すなわち符号Aで示す部分に、挿入体2の外側すなわち符号Bで示す部分に、更に外部添加の3つの組み合わせからなる。また、ゲル化剤が2種類のときは、同様に3つの組み合わせとなり、従って、以下の6通りの組み合わせがある。

- ①ゲル化剤が被検液と共に外部添加される場合
- ②ゲル化剤が透明容器の内面側に保持される場合。
- ③ゲル化剤が挿入体の外側に保持される場合。
- ④ゲル化剤の一方が透明容器の内面側に保持され、他方が外部添加される場合。
- ⑤ゲル化剤の一方が挿入体の外側に保持され、他方が外部添加される場合。
- ⑥ゲル化剤の一方が挿入体の外側に保持され

、他方が透明容器の内面側に保持される場合である。

前記①のゲル化剤は、一般に用いられている寒天のように、冷却によりゲル化するものであり、他にムーカラギーナン等がある。②、③および⑥のゲル化剤が透明容器または挿入体に保持される場合は、ゲル化剤が乾燥状態で保持され、被検液が添加されたときにゲル化し、その時、微生物自体がゲルの網目構造の中へ取り込まれることが望ましい。例えばゲル化した寒天を乾燥させたものに水分を加えても元の状態に復元しないので、ここでは適当でない。この条件を満足させるものとしては、冷水で膨潤するゲル化剤粉末がある。ローカストビーンガム、キサンタンガム、ムーカラギーナン、カルボキシメチルセルロース等のゲル化剤は室温の水で溶解するので冷水で膨潤するゲル化剤粉末として適当である。又、一度形成したゲルを乾燥被膜としたものでは、キサンタンガム、ローカストビーンガムの混合物、キサンタンガム、ローカストビーンガム、ムーカラギーナンの

混合物、キサンタンガム、ムーカラギーナンの混合物が適当であった。更に、④および⑤のゲル化剤の一成分を挿入体3、透明容器2のいずれか一方に保持させ、一方の成分を外部から溶液として添加するもので、その組み合わせ例としては、K<sup>+</sup>あるいはNa<sup>+</sup>とムーカラギーナン、Ca<sup>++</sup>あるいはMg<sup>++</sup>あるいはK<sup>+</sup>あるいはNa<sup>+</sup>とゲランガム、Ca<sup>++</sup>とアルギン酸ナトリウム等がある。ムーカラギーナンを用いる場合は、ムーカラギーナンを二つに分配し、一方はイオンを含んだ塩と共に乾燥被膜として挿入体、透明容器に保持させ、他方は溶液として外部から添加することができる。その場合、ムーカラギーナンの被膜量としては、総ムーカラギーナン量に対し2~60%の範囲で可能で、ムーカラギーナンがそれ以上になるとゲルの復元が困難になる。

次に、栄養分の配置構成としては、(1)透明容器の内面側、(2)挿入体の外側、(3)外部添加の3通りである。(1)および(2)の場合は、乾燥状態で保持させるのが望ましく、粉末または塗布乾燥のどちら

かにより被膜を作ればよい。栄養分の組成については増殖すべき、微生物の型により変動するので特に限定はされない。

各々の成分を、それぞれの透明容器、挿入体に保持するには、微生物の増殖を阻害しない適当な接着剤を用いればよく、好適な例としては澱粉、あるいはメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどのセルロース誘導体、ポリビニルビロリドン、アラビアゴム、ゼラチン等の親水性高分子接着剤がある。また、接着剤は、各種成分と混合した後塗布するか、または別個に塗布するようすればよい。

次にゲル化剤および栄養分を含む成分層の配置例および添加例について第11図ないし第28図を参照して説明する。

第11図に示した添加例は、透明容器2にゲル化剤、栄養分および微生物を液体状態で外部から同時に添加して、挿入体3を挿入し、蓋をして培養を行えばよい。第12図に示した例は、挿入体3の外側に栄養分が設けられ、そして透明容器2

には外部から微生物とゲル化剤が液体状態で添加される。第13図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分とゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第14図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分とゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第15図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分とゲル化剤が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第16図に示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部からゲル化剤の一部と栄養分および微生物が液体状態で添加される。第17図に示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物と栄養分が液体状態で添加される。第18図に示した例は、透明容器2の内面にゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物と栄養分およびゲル化剤の一部

が液体状態で添加される。第19図に示した例は、透明容器2の内面にゲル化剤が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物と栄養分とが液体状態で添加される。第20図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分が設けられ、かつ透明容器2の内面にはゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第21図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分が設けられ、かつ透明容器2の内面にゲル化剤が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物が液体状態で添加される。第22図に示した例は、挿入体3の外周面に栄養分とゲル化剤の一部が設けられ、かつ透明容器2の内面にはゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物が液体状態で添加される。第23図に示した例は、透明容器2の内面に栄養分とゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第24図に示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤の一部が設

けられ、かつ透明容器2の内面にはゲル化剤の一部が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物と栄養分とが液体状態で添加される。第25図に示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤の一部が設けられ、かつ透明容器2の内面にはゲル化剤の一部および栄養分が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物が液体状態で添加される。第26図に示した例は、透明容器2の内面に栄養分が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤が液体状態で添加される。第27図の示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤の一部が設けられ、かつ透明容器2の内面に栄養分が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物とゲル化剤の一部が液体状態で添加される。第28図に示した例は、挿入体3の外周面にゲル化剤が設けられ、かつ透明容器2の内面には栄養分が設けられ、そして透明容器2には外部から微生物が液体状態で添加される。なお、前記の各構造例において挿入体3の内面に対して任意の指示を設けておくことにより、星色、螢光、発光

検出が行えることになる。

次に、実験例について説明する。

#### 実験例 1

透明容器は透明なスチロール樹脂材料により有底筒状に射出成型した。透明容器の各寸法は、内底面の内径が30mm、開口面の内径が32mm、内底面から開口面までの高さが100mm、内底面の中心部に凸起（直径25.08mm、高さ1.5mm）を設ける。この突起は、後で説明する挿入体を支持する支持体と結合させるために使用される。

支持体は、スチロール樹脂により射出成型され、その各寸法は次の通りである。支持体は1.5mmの上げ底を有する有底筒状に形成してある。底部の外径は28.08mm、上端開口部の外径は30.08mm、高さ100mm、肉厚1.5mmである。上げ底の高さは1.5mmであり、この上げ底によって形成された底部空間部が前記の凸起に対し嵌め込んで結合される。支持体は、その上端開口面から下方に3mm、下端開口縁か

ら上方に 3 mm を除いて周面全体に直径 3 mm の孔が多数明けてある。支持体は透明容器内に押入され、支持体の底部開口部が透明容器の内底面の凸起に嵌め込まれ、支持体の位置決め保持が行われる。

支持体の外側に押入接着される押入体は、東洋滤紙（株）の分離滤紙 No. 2 S（厚さ 0.26 mm）を筒状に丸めたときに支持体の外径に見合う長さに切り取り、支持体に孔の明けてない部分に相当する部分の重なり部を水不溶性の接着剤を用いて接着し、それ以外の部分はカルボキシメチルセルロース（和光純薬社製）により接着して、押入体を形成した。

透明容器の中に支持体に接着されている押入体を押入し、透明容器の開口端から蓋をした。透明容器と押入体との密閉間隙は 0.7 mm である。このように構成した培養容器を  $\gamma$  線により放射線滅菌した。

#### 操作

種々の微生物を濃度約 10<sup>4</sup> (CFU = コロニー)

（形成単位）になるよう滅菌水にて希釈し、それぞれ 0.5 ml づつ透明容器内に分注した。

別の SCD プイヨン培地（栄研化学社製）と寒天（和光純薬社製）の混合物（濃度： 3% SCD プイヨン培地、 0.6% 寒天）を加熱溶解した後、オートクレーブにて滅菌し、45℃ の恒温槽中で保温しておいたものを、それぞれの菌液の入った透明容器内に 5 ml づつ添加し、菌液と良く混合するように混ぜ、寒天が固まらないうちに、透明容器に押入体を押し込み、蓋をする。このものを 37℃、48 時間、ふ卵器中で培養した。

対象として 3% SCD プイヨン培地、寒天の混合物（濃度 3% SCD プイヨン培地、1.5% 寒天）を同様に滅菌し、恒温槽中で保温したものを用意し、あらかじめ前記菌液を 0.5 ml 分注してある直径 9 cm の滅菌シャーレ（岩城硝子社製）に 20 ml 加え、培地と菌液が良く混合するよう十分に混ぜ、培地が凝固したらシャーレを倒置し、37℃、48 時間、ふ卵器中で培養した。

両者につき、コロニー数を計測した結果は第 1 表の通りであった。

第 1 表

| 細菌                     | 本発明法  |     | シャーレ法 |   |
|------------------------|-------|-----|-------|---|
|                        | のコロニー | 数   | のコロニー | 数 |
| Escherichia coli       | 85    | 80  |       |   |
| Enterobacter cloacae   | 125   | 135 |       |   |
| Citrobacter freundii   | 79    | 83  |       |   |
| Bacillus subtilis      | 45    | 42  |       |   |
| Pseudomonas aeruginosa | 60    | 54  |       |   |

#### 実験例 2

次の 4 つの方法について比較実験を行った。尚、① 本発明方法、② 対照法 1 および③ 対照法 2 で用いた培養容器の透明容器と支持体は前記実験例 1 に記載のものと全く同様である。

#### ① 本発明方法：

INT（同仁化学研究所製）とカルボキシメチルセルロースナトリウム（和光純薬社製）の混合溶液を乾燥時に INT 1 mg、カルボキシメチルセルロースナトリウム 20 mg を含有するように実験例 1 に記載の分離滤紙 No. 2 S に塗布し、乾燥したものを、塗布した面が支持体の外面と向かい合うように前記支持体に接着し、押入体とした。

#### ② 対照法 1：

実験例 1 に記載の通り、INT が含有していない押入体を用いた。

#### ③ 対照法 2：

上記の本発明方法において、塗布した面が支持体の外面とは逆の面、すなわちゲルと接触する面となるよう支持体に接着したものを押入した。

#### ④ 対照法（シャーレ法）：

実験例 1 と同様にシャーレ法を用いた。

#### 操作

Escherichia coli、Enterobacter cloacae、Citrobacter freundii

*bacter freundii*、*Bacillus subtilis* および *Staphylococcus aureus* の 5 種の細菌について菌濃度  $10^2$  (CFU) になるように滅菌水に希釈し、各々の菌種について 3 本づつ透明容器内に分注した。

別に SCD ブイヨン培地と寒天の混合物 (ブイヨン 3 %、寒天 0.6 %) を実験例 1 と同様に滅菌し、45℃ の恒温槽中で保温した。方法②については、予め水に溶かした後、マイレクス GV フィルター (日本ミリポアリミテッド社製) で除菌した INT 溶液を終濃度 0.2 % になるように上記寒天培地に添加したものを、方法①および③については、上記寒天培地を、それぞれ菌液の入った透明容器内に 5 ml づつ添加し、菌液とよく混合するように混ぜ、寒天が固まらないうちに、各々挿入体を押し込み蓋をする。この培養容器を 37℃、24 時間、ふ卵器中で培養した。方法④については、シャーレを用いて、37℃、24 時間ふ卵器中で培養した。

## 結果

培養した結果は、第 2 表に示す通りであった。

第 2 表

| 細菌                           | コロニー数 |       |       |       |
|------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|                              | 本発明法  | 対照法 1 | 対照法 2 | 対照法 3 |
| <i>Escherichia coli</i>      | 75    | 58    | 63    | 71    |
| <i>Enterobacter cloacae</i>  | 90    | 47    | 75    | 81    |
| <i>Citrobacter freundii</i>  | 37    | 20    | 28    | 40    |
| <i>Bacillus subtilis</i>     | 88    | 6     | 9     | 93    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 47    | 10    | 18    | 49    |

上記の結果から、呈色剤を用いて微生物を培養検出するに当たっては、対照法 1 の如く呈色剤を直接微生物の培地に加えて培養検出する場合、あるいは対照法 2 の如く挿入体の外面、すなわちゲルと接触する側の面に呈色剤層を設けて培養検出する場合には、最初から微生物と呈色剤が接触するため、微生物の増殖が妨げられて満足すべき検出が行えないのに対し、本発明方法の如く呈色剤層を挿入体の内面に設けて培養検出する場合には、微生物がその増殖の初期において、直接呈色剤と接触しないため、増殖が妨げられることなく、微生物が増殖できるので、従来のシャーレ法と同様の再現性のある微生物の培養検出が行えることを示している。

## 実験例 3

実験例 2 の①の挿入体に、更に外面にエーカラギーナン (和光純薬社製)、カルボキシメチルセルロースナトリウム、キサンタンガム (興人社製)、ローカストビーンガム (三榮化学工業社製)、SCD 培地の混合溶液を乾燥時にエーカラギー

ナン 5.5 mg、カルボキシメチルセルロースナトリウム 27.5 mg、キサンタンガム 88 mg、ローストビーンガム 11 mg、SCD ブイヨン培地 165 mg となるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 と同じ。

## 操作

約  $10^2$  CFU/ml 濃度の *Escherichia coli* 溶液を 50 ml 調製し、そのものを透明容器内部に 5 ml、0.5 ml、0.05 ml づつ添加し、滅菌水で合計が 5 ml になるように合わせ、それぞれ良く混合した。挿入体を押し込み蓋をしてふ卵器中で 37℃、24 時間培養後、コロニー数を計測した。なお、同じ菌液濃度に対し 3 本づつ実施した。その結果を第 3 表に示した。

第 3 表

| 細菌 | コロニー数 |   |   |
|----|-------|---|---|
|    | 1     | 2 | 3 |
|    |       |   |   |

|          |       |       |       |
|----------|-------|-------|-------|
| 5 ml     | > 300 | > 300 | > 300 |
| 0. 5 ml  | 60    | 63    | 56    |
| 0. 05 ml | 5     | 6     | 6     |

## 実験例 4

実験例 1 と同様の透明容器の内側に  $\alpha$ -カラギーナン、キサンタンガム、SCDブイヨン培地の混合溶液を乾燥時に  $\alpha$ -カラギーナン 5.0 mg、キサンタンガム 6.7 mg、SCDブイヨン培地 1.50 mg になるように塗布乾燥した。

挿入体は、実験例 2 と同様に INT とカルボキシメチルセルロースナトリウムを、分液漏紙 N. 2 S に塗布し、乾燥したものを塗布した面が支持体の外面と向かい合うよう前記支持体に接着した。

## 操作

約  $10^4$  CFU/ml の Escherichia coli 液を 50 ml に調製し、そのものを透明容器内部に 5 ml、0.5 ml、0.05

|         |       |    |
|---------|-------|----|
| 5 ml    | > 300 | —  |
| 0.5 ml  | 83    | 78 |
| 0.05 ml | 9     | 8  |

## 実験例 5

実験例 2 の①挿入体に、更に外面にカルボキシメチルセルロースナトリウム、キサンタンガム、SCDブイヨン培地の混合溶液を乾燥時にカルボキシメチルセルロースナトリウム 27.5 mg、キサンタンガム 8.8 mg、SCDブイヨン培地 1.50 mg になるように塗布乾燥した。

又、実験例 1 と同様の透明容器の内側に  $\alpha$ -カラギーナン、ローカストビーンガムの混合溶液を乾燥時に  $\alpha$ -カラギーナン 5.5 mg、ローカストビーンガム 1.1 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 に同じ。

## 操作

実験例 3 に同じ。その結果を第 5 表に示した。

ml づつ添加し、滅菌水で合計が 5 ml になるように合わせ、それぞれ良く混和した。そして、挿入体を押し込み、蓋をして、ふ卵器中で 37°C、24 時間培養後、コロニー数を計測した。

対象として、3% SCDブイヨン培地、1.5% 酢酸の混合溶液を同様に滅菌し恒温槽中で保温しておいたものを用意して前記菌液および前記菌液を滅菌水で 10 倍に希釈したものを各々 0.5 ml 分注してある直径 9 cm の滅菌シャーレに 20 ml を加え、培地と菌液がよく混和するように十分に混和し、培地が凝固したらシャーレを倒置し、37°C、24 時間、ふ卵器中で培養した。

本発明においては染色したコロニーを、対象においてはコロニーをそれぞれ肉眼で計測した。その結果を第 4 表に示した。

第 4 表

| 菌 液 | 本発明のコロニー数 | シャーレ法のコロニー数 |
|-----|-----------|-------------|
| —   | —         | —           |

第 5 表

| 菌 液     | コロニー数 |       |       |
|---------|-------|-------|-------|
|         | 1     | 2     | 3     |
| 5 ml    | > 300 | > 300 | > 300 |
| 0.5 ml  | 63    | 62    | 70    |
| 0.05 ml | 6     | 7     | 5     |

## 実験例 6

実験例 2 の挿入体に、更に外面に  $\alpha$ -カラギーナン、SCDブイヨン培地の混合溶液を乾燥時に  $\alpha$ -カラギーナン 1.0 mg、SCDブイヨン培地 1.50 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 に同じ。

## 操作

種々の細菌を温度約  $10^4$  CFU/ml になるように滅菌水で希釈したものをそれぞれ 0.5 ml づつ透明容器内に分注した。0.3%  $\alpha$ -カラ

ギーナン溶液をそれぞれの菌液の入った透明容器内に 5 ml づつ添加し、菌液とよく混合するように混ぜ、挿入体を押し込み蓋をする。このものを 37℃、24 時間、ふ卵器中で培養した。

対象として、実験例 1 と同様、シャーレによる方法を行った。本発明においては染色されたコロニーを、対象においてはコロニーをそれぞれ肉眼で計測した。その結果を第 6 表に示した。

第 6 表

| 細菌                   | 本発明のコロニー数 | シャーレ法のコロニー数 |
|----------------------|-----------|-------------|
| Escherichia coli     | 72        | 75          |
| Enterobacter cloacae | 43        | 41          |
| Citrobacter freundii | 48        | 53          |

蓋をして、ふ卵器中で 37℃、24 時間培養後、染色されたコロニー数を計測した。なお、同じ菌種につき 2 本づつ実施した。その結果を第 7 表に示した。

第 7 表

| 細菌                   | コロニー数 |    |
|----------------------|-------|----|
|                      | 1     | 2  |
| Escherichia coli     | 76    | 73 |
| Enterobacter cloacae | 49    | 52 |
| Citrobacter freundii | 63    | 60 |

実験例 8

実験例 1 の挿入体の外面に α-カラギーナン（和光純薬社製）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、キサンタンガム（興人社製）、ローカストビーンガム（三栄化学工業社製）、SCD 培地の混合溶液を乾燥時に α-カラギーナン 5.5 mg

|                        |     |     |
|------------------------|-----|-----|
| Bacillus subtilis      | 6.3 | 5.8 |
| Pseudomonas aeruginosa | 5.9 | 6.5 |

実験例 7

実験例 1 と同様の透明容器の内側に、カルボキシメチルセルロースナトリウム、α-カラギーナン、SCD プライオン培地の混合物を乾燥時にカルボキシメチルセルロースナトリウム 2.7, 5 mg、α-カラギーナン 1.0 mg、SCD プライオン培地 1.50 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 2 ①と同じ。

## 操作

0.3% α-カラギーナン溶液を用いて、約 10<sup>2</sup> CFU/ml 濃度の Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii の各細菌溶液を調製し、それぞれ 5 ml を透明容器内部に添加し、素早く挿入体を押し込み、

カルボキシルメチルセルロースナトリウム 2.7, 5 mg、キサンタンガム 8.8 mg、ローカストビーンガム 1.1 mg、SCD プライオン培地 1.65 mg となるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 と同じ。

## 操作

約 10<sup>2</sup> CFU/ml 濃度の Escherichia coli 液を 5.0 ml 調製し、そのものを透明容器内部に 5 ml, 0.5 ml, 0.05 ml づつ添加し、滅菌水で合計が 5 ml になるように合わせ、それぞれよく混合した。挿入体を押し込み、蓋をして、ふ卵器で 37℃、24 時間培養後、コロニー数を計測した。なお、同じ菌液濃度に対し 3 本づつ実施した。その結果を第 8 表に示した。

第 8 表

| 細菌 | コロニー数 |   |   |
|----|-------|---|---|
|    | 1     | 2 | 3 |
|    |       |   |   |

|         |       |       |       |
|---------|-------|-------|-------|
| 5 ml    | > 300 | > 300 | > 300 |
| 0.5 ml  | 70    | 75    | 68    |
| 0.05 ml | 6     | 7     | 7     |

## 実験例 9

実験例 1 と同様の透明容器の内側に、 $\alpha$ -カラギーナン、キサンタンガム、SCDブイヨン培地混合溶液を乾燥時に、 $\alpha$ -カラギーナン 5.0 mg、キサンタンガム 6.7 mg、SCDブイヨン培地 15.0 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 に同じ。

## 操作

約  $10^8$  CFU/ml 濃度の Escherichia coli 溶液を 5.0 ml 調製し、そのものを透明容器の内部に 5 ml、0.5 ml、0.05 ml づつ添加し、滅菌水で合計が 5 ml になるように合わせ、それぞれよく混合した。挿入体を押し込み、蓋をして、ふ卵器中で 37℃、24 時間培養後、コロニー数を計測した。

チルセルロースナトリウム、キサンタンガム、SCDブイヨン培地の混合溶液を乾燥時にカルボキシメチルセルロースナトリウム 2.7.5 mg、キサンタンガム 8.8 mg、SCDブイヨン培地 15.0 mg になるように塗布乾燥した。

又、実験例 1 と同様の透明容器の内側に $\alpha$ -カラギーナン、ローカストビーンガムの混合溶液を乾燥時に $\alpha$ -カラギーナン 5.5 mg、ローカストビーンガム 1.1 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 に同じ。

## 操作

実験例 8 に同じ。その結果を第 10 表に示した。

## 第 10 表

| 細菌     | コロニー数 |       |       |
|--------|-------|-------|-------|
|        | 1     | 2     | 3     |
| 5 ml   | > 300 | > 300 | > 300 |
| 0.5 ml | 75    | 71    | 69    |

対象として、3% SCDブイヨン培地、1.5%寒天の混合溶液を同様に滅菌し、恒温槽中で保温しておいたものを用意して、前記菌液を滅菌水で 10 倍に希釈したものを各々 0.5 ml 分注してある直徑 9 cm の滅菌シャーレに 20 ml を加え、培地と滅菌液がよく混合するように十分に混ぜし、培地が凝固したらシャーレを倒置し 37℃、24 時間、ふ卵器で培養後、コロニーをそれぞれ肉眼で計測した。その結果を第 9 表に示した。

## 第 9 表

| 菌液      | 本発明のコロニー数・コロニー数 |    |
|---------|-----------------|----|
| 5 ml    | > 300           | —  |
| 0.5 ml  | 87              | 78 |
| 0.05 ml | 9               | 8  |

## 実験例 10

実験例 1 と同様の挿入体の外側にカルボキシメ

|         |   |   |   |
|---------|---|---|---|
| 0.05 ml | 8 | 7 | 7 |
|---------|---|---|---|

## 実験例 11

実験例 1 の挿入体の外面に $\alpha$ -カラギーナン、SCDブイヨン培地の混合溶液を乾燥時に $\alpha$ -カラギーナン 1.0 mg、SCDブイヨン培地 15.0 mg になるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例 1 に同じ。

## 操作

種々の細菌を濃度約  $10^8$  CFU/ml になるように滅菌水で希釈したものをそれぞれ 0.5 ml づつ透明容器内に分注した。0.3%  $\alpha$ -カラギーナン溶液をそれぞれの菌液の入った透明容器内に 5 ml づつ添加し、菌液と良く混合するように混ぜ、挿入体を押し込み、蓋をする。このものを 37℃、48 時間、ふ卵器で培養した。

対象として、実験例 1 と同様、シャーレによる方法を行った。

コロニーをそれぞれ肉眼で計測した。その結果を第 11 表に示した。

第11表

| 細菌                     | 本発明のコロニー数 | シャーレ法のコロニー数 |
|------------------------|-----------|-------------|
| Escherichia coli       | 60        | 57          |
| Enterobacter cloacae   | 28        | 30          |
| Citrobacter freundii   | 70        | 65          |
| Bacillus subtilis      | 60        | 69          |
| Pseudomonas aeruginosa | 25        | 28          |

## 実験例 1-2

実験例1と同様の透明容器の内側に、カルボキシメチルセルロースナトリウム、 $\kappa$ -カラギーナン、SCDブイヨン培地の混合物を乾燥時にカル

ボキシメチルセルロースナトリウム27.5mg、 $\kappa$ -カラギーナン10mg、SCDブイヨン培地150mgになるように塗布乾燥した。

その他の構成は実験例1と同じ。

## 操作

① 3% $\kappa$ -カラギーナン溶液を用いて約10%CFU/ml濃度のEscherichia coli、Enterobacter cloacae、Citrobacter freundiiの各細菌溶液を調製し、それぞれ5mlを透明溶液内部に添加し、挿入体を素早く押し込み、蓋をして、ふ卵器中で37℃、24時間培養後、染色されたコロニー数を計測した。なお、同じ菌種につき2本づつ実施した。その結果を第12表に示した。

第12表

| 細菌 | コロニー数 |   |
|----|-------|---|
|    | 1     | 2 |

| 細菌                   | 1  | 2  |
|----------------------|----|----|
| Escherichia coli     | 58 | 50 |
| Enterobacter cloacae | 75 | 77 |
| Citrobacter freundii | 60 | 62 |

## 〔発明の効果〕

本発明は以上説明したように、被験液を透明容器に添加し、通気性を有するが、透水性が非常に低くかつその細孔が微生物より小さいシートからなる挿入体を透明容器に挿入し、透明容器と挿入体との間に存在する栄養分およびゲル化剤を含む成分層の表面および/または内部において被験液中の微生物を培養し、該培養によって増殖した微生物を透明容器外から検出するようにしたので、以下に列挙する如く種々の効果が得られる。

(1) 被験液は單にある一定量を透明容器に添加するだけあって、被験液を培養容器に添加する場合の熟練度を必要としないので、常に均一な培養が行える。

(2) 透明容器に挿入体を挿入することにより、被

験液が容易かつ非常に均一に分散されるので、被験液を培地に均一に分散せしめるための熟練度も必要としない。

(3) 透明容器の中で直接被験液の希釈ができるので、被験液の希釈の手間が簡略化される。

(4) 従来の寒天温度(シャーレ法では通常1.5~2.0%程度)より低い温度でも微生物の培養検出が可能である。

(5) 挿入体として使用するシートが安価であるため、培養容器全体のコストを低減化できる。

(6) 微生物の検出結果がシャーレ法との相関性が高く、従来の簡易培養検出法に比べて検出結果の信頼度が高い。

(7) 自動検出機との連動化が容易である。

(8) 培地と接触する挿入体の面の逆の面に指示薬層を設けることにより、シートの材質と相まって微生物の増殖が進行するまで、できる限り指示薬と微生物との接触を遅らせることができるので、微生物の増殖が妨げられることなく進行するため、指示薬の影響を受けやすい微生物であっても

、シャーレ法との相間性の高いコロニーの検出が行えることになる。

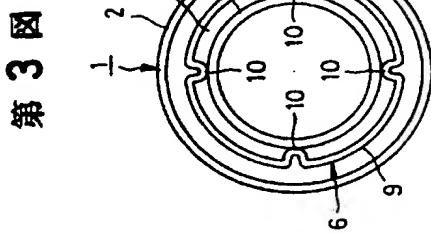
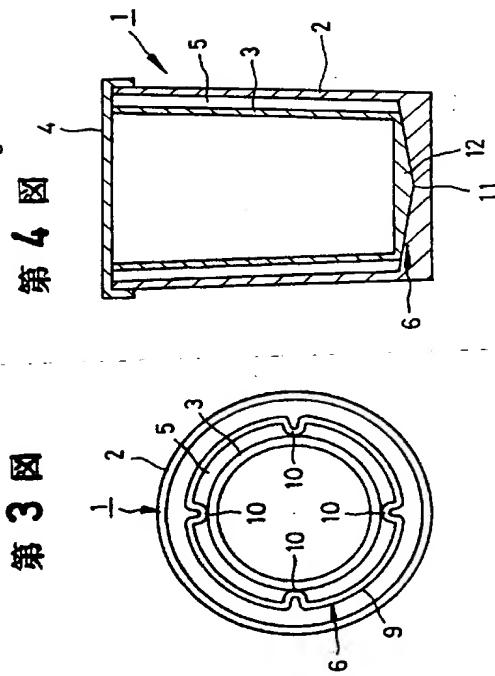
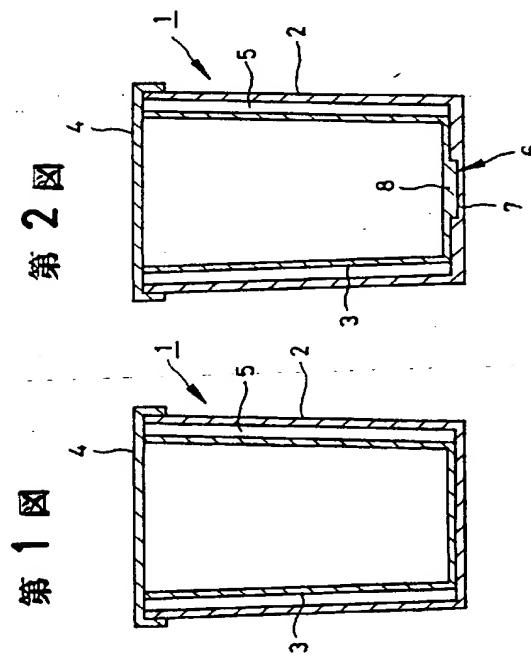
#### 4. 図面の簡単な説明

図面は本発明の方法を実施するための好適な培養容器を示したものであり、第1図は第1実施による培養容器の縦断面図、第2図は第2実施例による培養容器の縦断面図、第3図は第3実施例による培養容器の平面図、第4図は第4実施例による培養容器の縦断面図、第5図は第5実施例による培養容器の平面図、第6図は第5図における透明容器の斜面図、第7図は第6実施例による培養容器の水平断面図、第8図は第7実施例による培養容器の縦断面図、第9図(a)、(b)、(c)はそれぞれ異なる支持体の斜面図、第10図は培養成分層の配置例を説明するための部分説明図、第11図ないし第28図は培養成分層の配置例および添加例のそれぞれ異なる場合の説明図である。

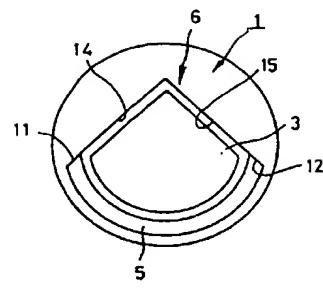
#### 符号の説明

1 . . . 培養容器

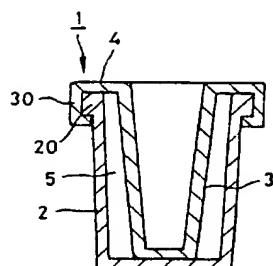
- 2 . . . 透明容器
- 3 . . . 接入体
- 4 . . . 蓋
- 5 . . . 間隙
- 6 . . . 支持体
- A . . . 透明容器の内面側に形成した成分層
- B . . . 接入体の外面側に形成した成分層
- C . . . 接入体の内面側に形成した指示薬層



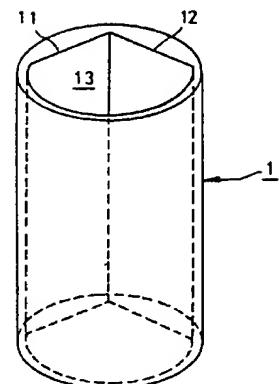
第5図



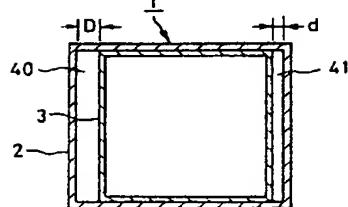
第8図



第6図

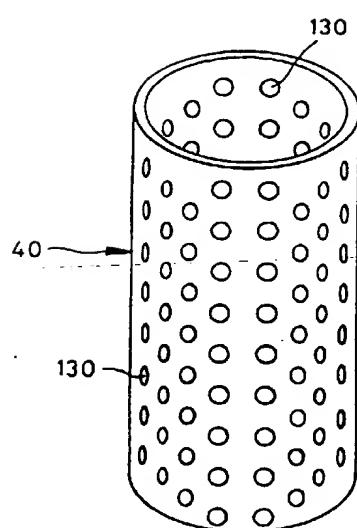


第7図

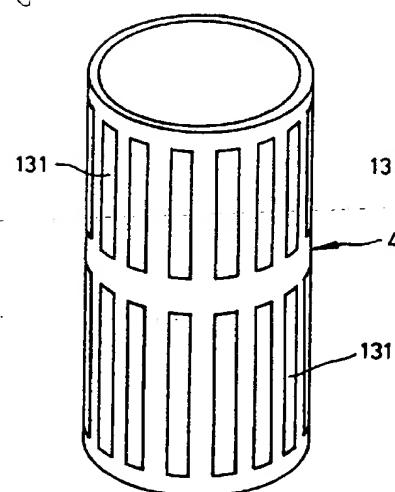


第9図

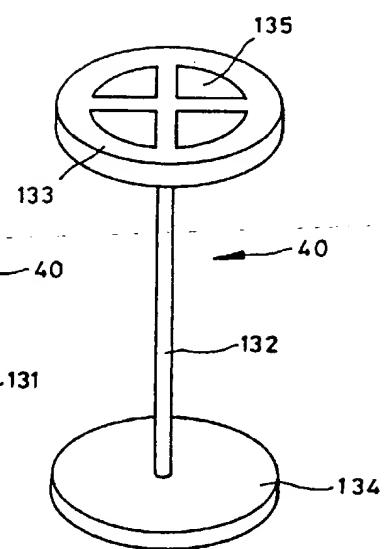
(a)



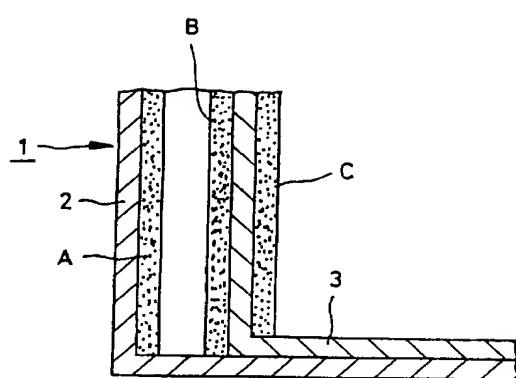
(b)



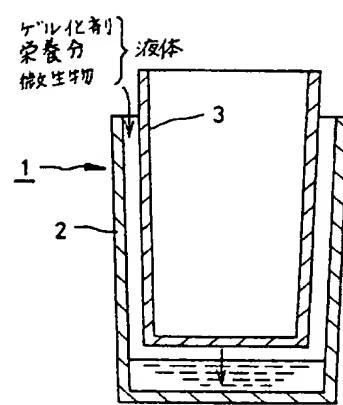
(c)



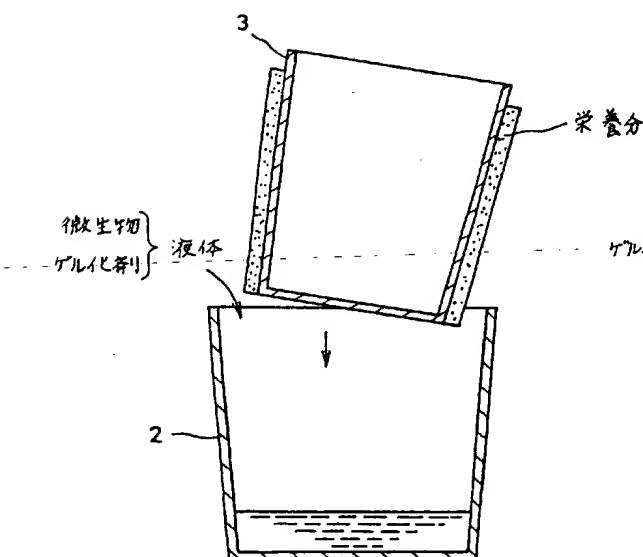
第10図



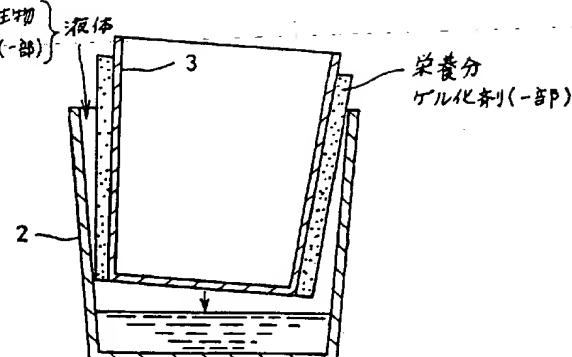
第11図



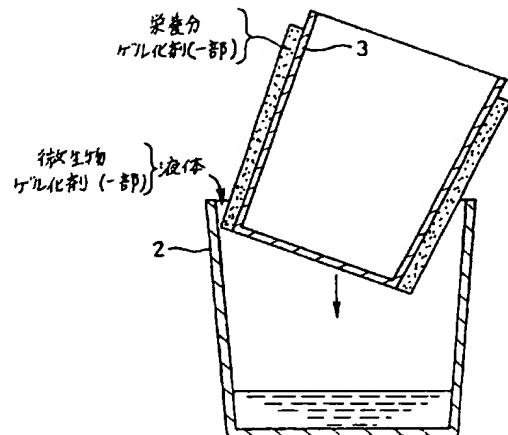
第12図



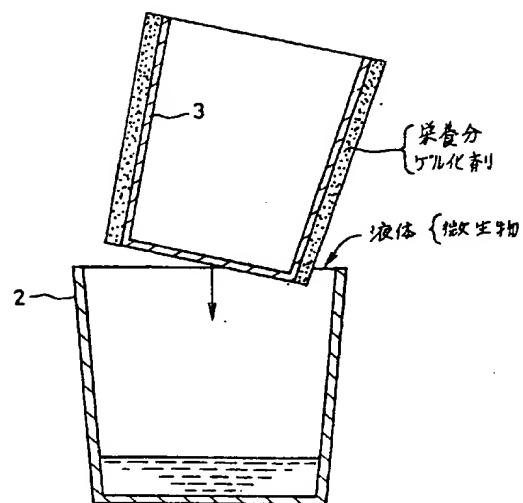
第13図



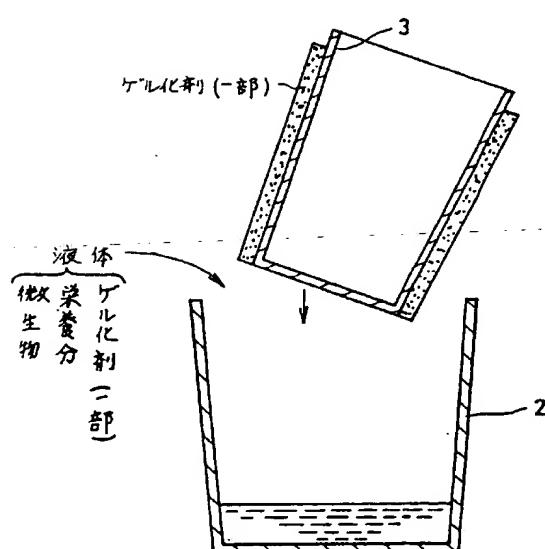
第14図



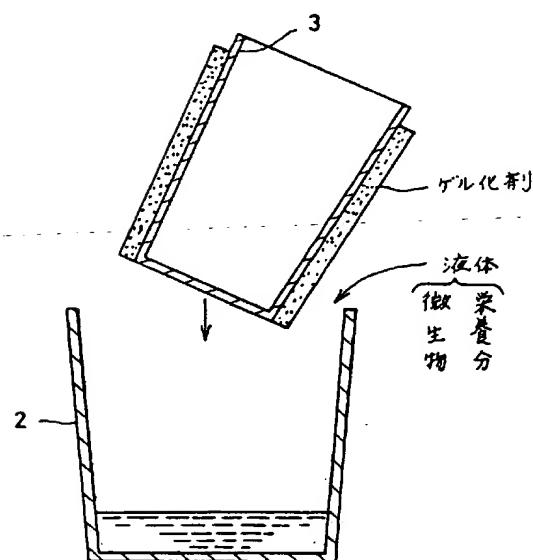
第15図



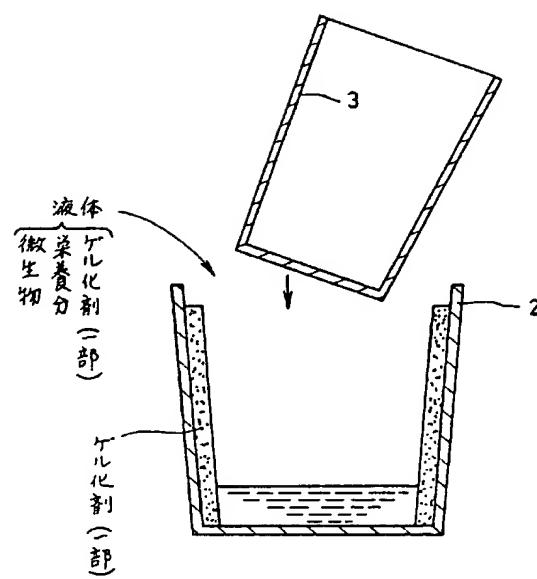
第16図



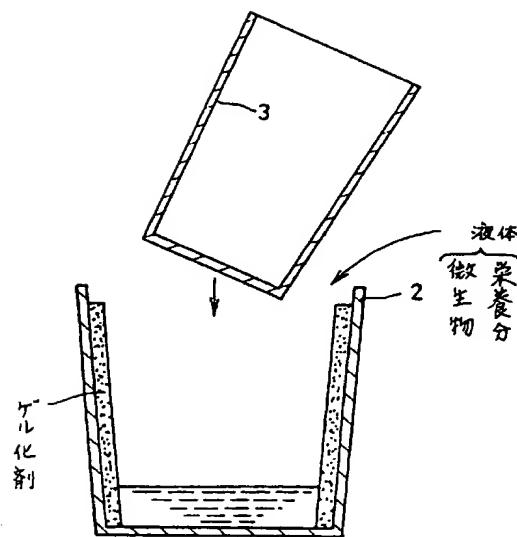
第17図



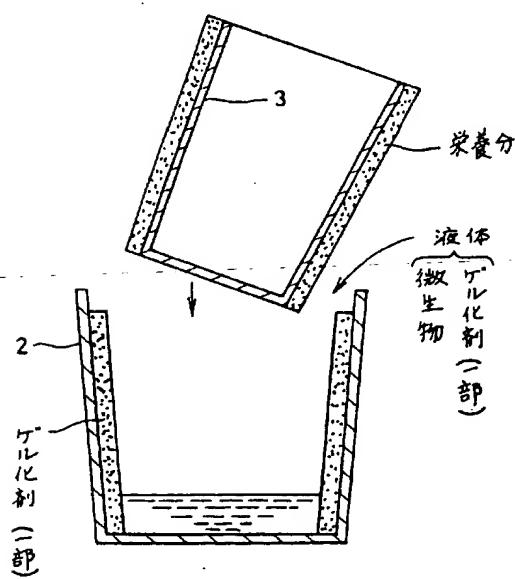
第18図



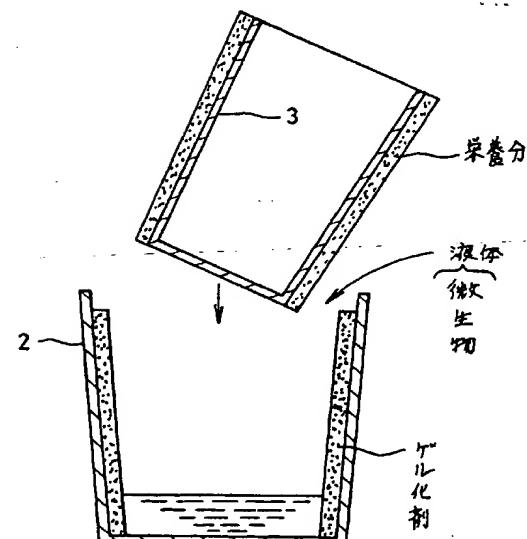
第19図



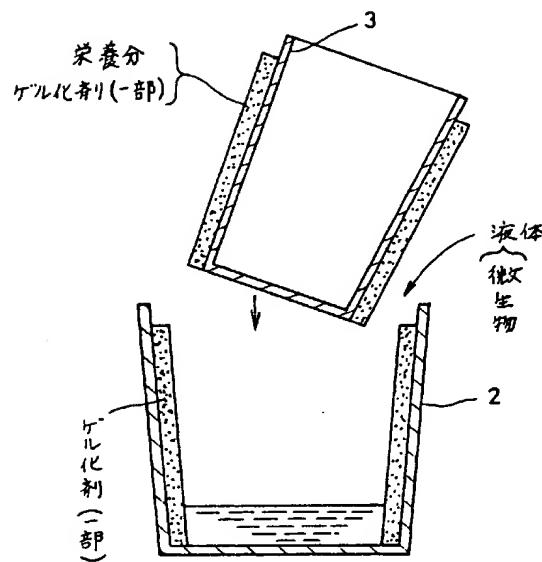
第20図



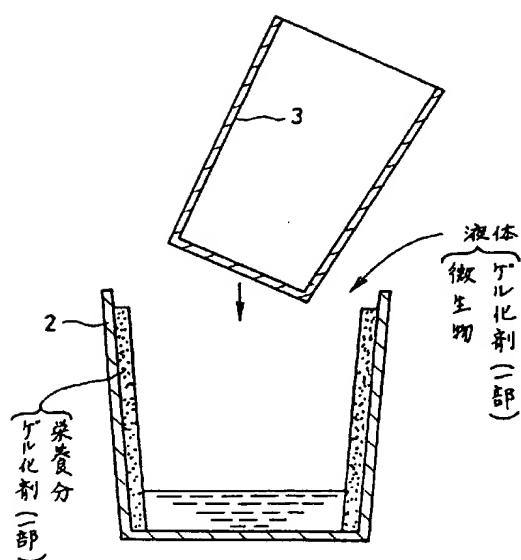
第21図



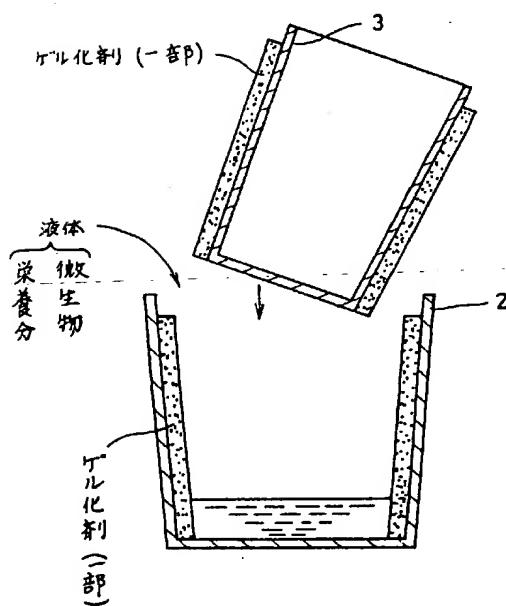
第22図



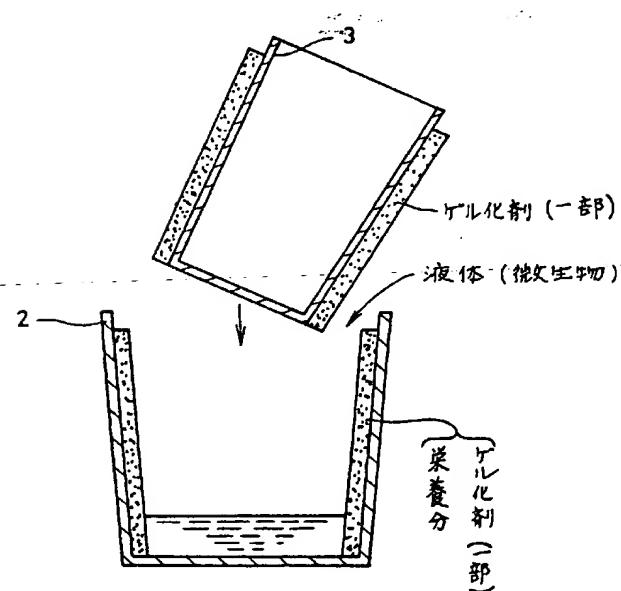
第23図



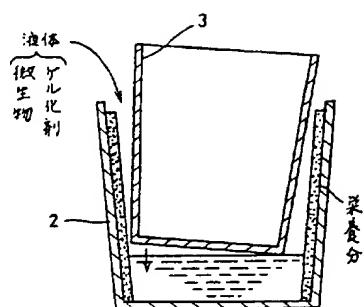
第24図



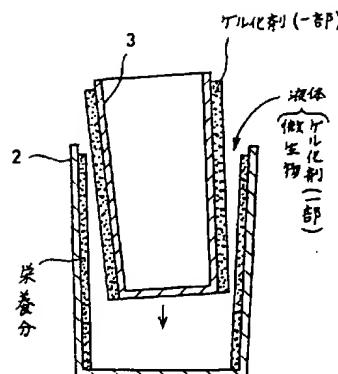
第25図



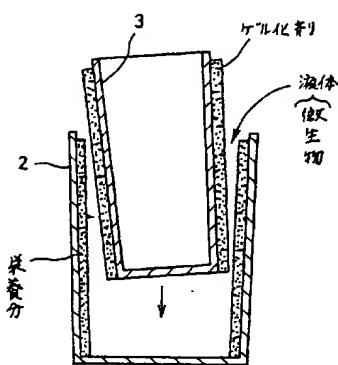
第26図



第27図



第28図



## 手続補正書

平成1年10月13日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

昭和63年 特許願 第309257号

## 2. 発明の名称

微生物の培養検出方法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

名称 東洋醸造株式会社

## 4. 代理人 〒170

東京都豊島区北大塚2-25-1

太陽生命大塚ビル3階 電話(917)1917

(7528)弁理士 小林和憲

(ほか1名)

## 6. 補正の内容

(1)明細書の特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

(2)明細書第9頁上から1行目「微生物より小さい細孔を有する」とあるを「微生物が通過できない」と訂正する。

(3)明細書第13頁上から10行目「押入体2」とあるを「押入体3」と訂正する。

(4)明細書第16頁下から8行目「止凹部30を係止凸部」とあるを「止凹部30を外方向に引っ張り変形させて係止凸部」と訂正する。

(5)明細書第17頁下から9行目ないし8行目「細孔が微生物より小さい」とあるを「微生物が通過できない」と訂正する。

(6)明細書第18頁上から2行目「その細孔」とあるを「細孔」と訂正する。

(7)同頁上から3行目「大きさ」とあるを「性質」と訂正する。

(8)明細書第19頁上から3行目「かつその細孔が……のもとす」とあるを「かつ微生物が通

特許庁  
1.10.16

過できないような材質のもの、例えばその細孔が微生物より小さい材質のものとす」と訂正する。

(9)明細書第20頁上から1行目「該指示薬が」とあるを「該指示薬を」と訂正する。

(10)明細書第23頁上から11行目「添加される場合」とあるを「添加される場合。」と訂正する。

(11)明細書第53頁表の下から4行目「その細孔が微生物より」とあるを「被検液中の微生物が通過できない」と訂正する。

#### 補正した特許請求の範囲

「(1)被検液を透明容器に添加し、該透明容器に通気性を有するが透水性が非常に低くかつ被検液中の微生物が通過できないシートからなる挿入体を挿入し、該透明容器と挿入体との間に存在する栄養分およびゲル化剤を含む成分層の表面および/または内部において被検液中の微生物を培養せしめ、該培養によって増殖した微生物を透明容器外から検出するようにしたことを特徴とする微生物の培養検出方法。

(2)挿入体の内面側に指示薬を保持してなる請求項1記載の微生物の培養検出方法。

(3)シートが通気性および透水性を有し、しかも細孔が被検液中の微生物よりも大きくてよいシートを撥水処理することにより得られた撥水処理シートである請求項1または2記載の微生物の培養検出方法。

(4)撥水処理シートがシリコン処理紙、ポリエチレン処理紙またはシリコン処理布である請求項3

#### 記載の微生物の培養検出方法。

(5)シリコン処理紙がシリコン処理分液漉紙である請求項4記載の微生物の培養検出方法。

(6)指示薬が呈色剤、蛍光剤または発光剤である請求項2記載の微生物の培養検出方法。

(7)微生物が増殖する間に挿入体の内面側に保持している指示薬が成分層に移行して微生物と指示薬とが接触することにより生じる呈色、蛍光または発光を検出してなる請求項1、2または6記載の微生物の培養検出方法。

(8)成分層のゲル化剤が

①被検液と共に外部より添加される場合、

②透明容器の内面側に保持されている場合、

③挿入体の外側に保持されている場合、

④一方が透明容器の内面側に保持され、他方が外部より添加される場合、

⑤一方が挿入体の外側に保持され、他方が外部より添加される場合、および

⑥一方が透明容器の内面側に保持され、他方が挿入体の外側に保持されている場合。

の群より選ばれた形態で存在せしめられることを特徴とする請求項1または2記載の微生物の培養検出方法。

(9)成分層の栄養分が

①被検液と共に外部より添加される場合、

②透明容器の内面側に保持されている場合、および

③挿入体の外側に保持されている場合、

の群より選ばれた形態で存在せしめられることを特徴とする請求項1、2または8記載の微生物の培養検出方法。

(10)ゲル化剤および/または栄養分が透明容器および/または挿入体に保持される場合には、乾燥状態で保持されることを特徴とする請求項8または9記載の微生物の培養検出方法。

以上